

Eltérő dózisú trichotecénvázak mikotoxin terhelés hatása pontyok (*Cyprinus carpio* L.) lipidperoxidációs és glutation redox paramétereire

Pelyhe Csilla¹, Kövesi Benjámin¹, Zándoki Erika², Mézes Miklós¹, Balogh Krisztián¹

¹Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
2103 Gödöllő, Páter Károly utca 1.

²MTA-Kaposvári Egyetem, Mikotoxinok az élelmiszerláncban Kutatócsoport,
7400 Kaposvár, Guba Sándor utca 40.
Pelyhe.Csilla@mkk.szie.hu

Összefoglalás

Kísérletünk során T-2 toxin és deoxinivalenol (DON) hatását vizsgáltuk egynyaras pontyok (n=154; testsúly 35,92±2,82 g) szervezetére 0,25, 0,50 és 3,00 mg/kg testtömeg (ttm.) dózisban. A mikotoxinokkal mesterségesen szennyezett vagy kontroll takarmányt, egy hét akklimatizációs időt követően, szondán keresztül közvetlenül a halak gyomrába juttattuk. A mintavételek a takarmány bejuttatását követően 8 óránként történtek 24 órán keresztül, amely során csoportonként 6 egyedből vettünk májmintákat, amelyekből mértük a redukált glutation (GSH) tartalmat, a glutation-peroxidáz (GPx), glutation-reduktáz (GR) és glutation S-transzferáz (GST) aktivitást, annak érdekében, hogy felmérjük az antioxidáns rendszer mikotoxin terhelésre bekövetkező változásait. A lipidperoxidációs változások nyomon követése céljából mértük a konjugált diének (CD) és -triének (CT), valamint a malondialdehid (MDA) mennyiségét. Az egyszeri, gyomorszondán át bejuttatott, mikotoxin dózisok rövid időn belül fokozták a pontyok májában - a xenobiotikum transzformáció központjában - a lipidperoxidációs folyamatokat, amelyet az emelkedett CD és CT értékek jeleztek. A megnövekedett reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) terhelés hatására a glutation redox rendszer gyorsan aktiválódott, ami képes volt eliminálni az alkalmazott dózisban vizsgált mikotoxinok által generált káros peroxidatív folyamatokat, így a lipidperoxidációs folyamatok végterméke, az MDA tartalom, a vizsgált időszak alatt, nem emelkedett meg szignifikáns mértékben.

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

A T-2 toxin és a deoxinivalenol (DON) halak szervezetére kifejtett hatásai jelenleg még kevésbé ismertek a szakirodalomban.

Woodward és mtsai (1983) és Hooft és mtsai (2011) csökkent takarmányfelvételt és testtömeg-gyarapodást és romló takarmány-értékesítés tapasztaltak szivárványos pisztrángokkal (*Oncorhynchus mykiss*) végzett etetési kísérletek során DON terhelés hatására. Teljes takarmány visszautasítást 20 mg DON/kg takarmány dózis esetén tapasztaltak (Woodward és mtsai 1983). Hasonló hatásokat tapasztaltak atlanti lazac (*Salmo salar*) esetén 3,7 mg DON/kg takarmány hatására (Döll és mtsai 2010). Hooft és mtsai (2011) pedig kóros szövettani elváltozásokat észleltek pisztrángok májában és belében. Ezekkel ellentétben a csatornaharcsa (*Ictalurus punctatus*) takarmány fogyasztására, hematokrit értékére és relatív májtömegére nem volt hatással 10 mg DON/kg takarmány dózis. A halak mortalitása alacsonyabb volt a nagyobb DON dózisok hatására, mint 5,0 mg DON/kg takarmányt fogyasztó csoportban. A DON tartalmú takarmányt fogyasztó csoportokban alacsonyabb volt

továbbá az *Edwardsiella ictaluri* fertőzöttség a kontrollhoz viszonyítva (Manning és mtsai 2013).

A halfajok közötti különbségek összefüggésben állhatnak Guan és mtsai (2009) eredményeivel, ahol 9 halfajban vizsgálták bél mikrobiális közösségek trichotecénvázas mikotoxin bontási képességét. A vizsgált fajok közül egyedül a törpeharcsa (*Ameiurus nebulosus*) esetén tapasztaltak bontási képességet, ahol a DON-ból deepoxi-DON keletkezett. Ez a mikrobiális közösség más trichotecénvázas mikotoxinok transzformálására is képes volt, ahol deacetyl és/vagy deepoxi termékek keletkeztek, bár a T-2 toxin bontását nem vizsgálták. Metabolikus különbségeket találtak továbbá a trichotecénvázas mikotoxinok detoxifikálását tekintve a szárazföldi és vízi szervezetek között (Wu és mtsai 2011; Maul és mtsai 2012; Uhling és mtsai 2013; Wu és mtsai 2014). Ponty fajban például több különböző metabolikus útvonalat is megfigyeltek a T-2 toxin metabolizációjában (Wu és mtsai 2011).

Csatornaharcsákban 0,625-5,0 mg/kg takarmány T-2 toxin terhelés hatására csökkent növekedést és emelkedett mortalitást tapasztaltak, de csak 2,5 mg/kg takarmány dózis felett (Manning és mtsai 2003). Pontyoknál (*Cyprinus carpio*) hasonló eredményeket tapasztaltak 0,52 és 2,45 mg T-2 toxin/kg takarmány dózis hatására (Balogh és mtsai 2009). Poston és mtsai (1983) csökkent takarmány felvételt és növekedést, valamint alacsonyabb hematokrit és hemoglobinn értékeket tapasztaltak szivárványos pisztrángokban 2,5 mg T-2 toxin/kg takarmány dózis felett.

Korábban megállapították, hogy a sejtekben zajló biokémiai változásokkal összefüggésben a trichotecénvázas mikotoxinok hosszú távú hatására fokozódik a lipidperoxidációs folyamatok intenzitása, amely kihat a biológiai antioxidáns rendszer működésére is (Mézes és mtsai 1998; Surai és mtsai 2002).

Sanden és mtsai (2012) emelkedett CYP1A mRNS értékeket találtak 2 mg és 3 mg DON/kg takarmány dózisban zebradánió (*Danio rerio*) májak vizsgálatánál. Továbbá, Kravchenko és mtsai (1989) a T-2 toxin xenobiotikum transzformáló rendszerre kifejtett hatásait vizsgálva pontyokban mérsékelt emelkedést tapasztalt a glutathion S-transzferáz (GST) aktivitásban. A hosszútávú T-2 toxin terhelés hatására ugyanakkor 0,52 és 2,45 mg T-2 toxin/kg takarmány dózisok emelkedett glutathion (GSH) tartalmat valamint glutathion-peroxidáz (GPx) aktivitást eredményeztek, míg a lipidperoxidációs folyamatok végterméke a malondialdehid (MDA) nem változott szignifikáns mértékben (Balogh és mtsai 2009).

A fentiek alapján, célunk volt megállapítani, hogy rövid távú *per os* T-2 toxin vagy DON terhelés milyen mértékű hatást gyakorol a lipidperoxidációs és antioxidáns védőrendszer változásaira egynyaras pontyokban 24 órás toxin expozíció alatt.

2. Anyag és módszer

Kísérletünk során T-2 toxin és deoxinivalenol (DON) hatását vizsgáltuk egynyaras pontyok ($35,92 \pm 2,82$ g) szervezetére 0,25, 0,50 és 3,00 mg/kg testtömeg dózisban, 24 órán át, 8 óránkénti mintavétellel.

Egy hét akklimatizációs időt követően közvetlenül a halak gyomrába, szondával juttattuk be a mikotoxinokkal mesterségesen szennyezett vagy kontroll takarmányt.

A mintavételek során 6-6 állatból *post mortem* májmintákat vettünk a szondázást követően 8, 16 és 24 órával. A mintákat a biokémiai vizsgálatok elvégzéséig -20°C -on tároltuk. A májmintákból mértük a redukált glutathion tartalmat (GSH), glutathion-peroxidáz

(GPx), glutation-reduktáz (GR) és glutation S-transzferáz (GST) aktivitást, hogy felmérjük az antioxidáns rendszer változásait. A lipidperoxidációs változások nyomon követése céljából mértük a konjugált diének (CD) és -triének (CT), valamint a malondialdehid (MDA) mennyiségét.

A redukált glutation koncentrációt *Sedlak és Lindsay* (1968) módszerével mértük 5,5'-ditiobisz-2-nitrobenzoesav reagenssel. A glutation-peroxidáz aktivitást *Matkovics és mtsai* (1988) által leírt módszerrel határoztuk meg egy végpontos direkt assay során, redukált glutation és kumulatív-hidroperoxid ko-szubsztrátok jelenlétében. A fehérjekoncentráció meghatározása a máj homogenizátum 10.000 g szupernatans frakciójában Folin-fenol módszerrel történt, szarvasmarha szérum albumin standard felhasználásával (*Lowry és mtsai*, 1952). A konjugált dién és -trién tartalom meghatározása a májminták lipid tartalmának 2,2,4-trimetilpentánban való kivonását követően 232 nm-en, illetve 268 nm-en mutatott abszorpció alapján történt (AOAC, 1984). A malondialdehid tartalom meghatározását *Placer és mtsai* (1964) módszere alapján végeztük savanyú közegben, magas hőmérsékleten való komplex képzés alapján, 2-tiobarbitursavval. A májminták glutation-reduktáz aktivitásának meghatározása *Smith és mtsai* (1988), míg glutation-S-transzferáz aktivitásának vizsgálata *Mannervik és mtsai* (1985) által leírt módszer alapján történt.

Az eredmények statisztikai értékelését STATISTICA for Windows 4.5 programmal (*StatSoft Inc.*, 1993) végeztük. A normalitás vizsgálatot, majd a kiugró értékek kizárását követő varianciaanalízis (ANOVA) során a Fisher-féle legkisebb szignifikáns különbség (LSD) tesztet alkalmaztuk a szignifikáns ($p < 0,05$) különbségek megállapítására.

3. Eredmények és értékelésük

A kísérlet során a 3,0 mg T-2 toxin/kg ttm. csoportban jelentős mértékű, 18,2%, mortalitást tapasztaltunk a toxinterhelést követő 8. és 16. óra között. A többi csoportban, illetve mintavételi időpontban mortalitás nem volt.

A CD és CT értékek esetén a kontrollhoz képest egyaránt emelkedett értékeket tapasztaltunk ($p < 0,01$) a 0,25 és 0,5 mg és 3,0 DON/kg ttm. csoportokban 16 óra toxin kitettséget követően. T-2 toxin terhelés hatására a 3,0 mg /kg ttm. csoportban ($p < 0,05$) kizárólag a CD érték nőtt a 8. órai mintavétel során. Az MDA tartalom szignifikáns mértékben csak a 3,0 mg DON/kg ttm. csoportban nőtt a kezelést követő 16. és 24. órában.

Az eredmények alapján levonható az a következtetés, hogy mindkét trichotecénvázis mikotoxin terhelés hatására nőtt a lipidperoxidációs folyamatok intenzitása, a malondialdehid tartalom változása alapján azonban úgy tűnik, hogy a szervezet antioxidáns rendszere képes volt eliminálni az alkalmazott dózisokban a mikotoxinok által generált peroxidatív folyamatokat, mivel azok csak az iniciációs fázisban (CD és CT tartalom) jelentkeztek, a terminációs szakaszt (MDA tartalom) azonban nem érték el. Ennek oka feltehetően az, hogy a takarmány részek előzetes vizsgálatunk eredményei szerint 16 óra alatt ürülnek ki a szervezetből, azaz ennyi idő áll rendelkezésre a mikotoxinok felszívódásához.

A GSH tartalom mindhárom T-2 toxin kezelt, valamint a 3,0 mg DON/kg ttm. csoportban szignifikáns mértékben ($p < 0,05$) emelkedett a mikotoxin-expozíció 16. órájában.

A GPx aktivitás a 0,5 és 3,0 mg DON, valamint a 0,5 és 3,0 mg T-2 toxin/kg ttm. kezelt csoportban nőtt a 16. órát követően ($p < 0,01$), illetve a 3,0 mg T-2 toxin/kg ttm. kezelt csoportban ($p < 0,01$) már a 8. órai mintavétel alkalmával is.

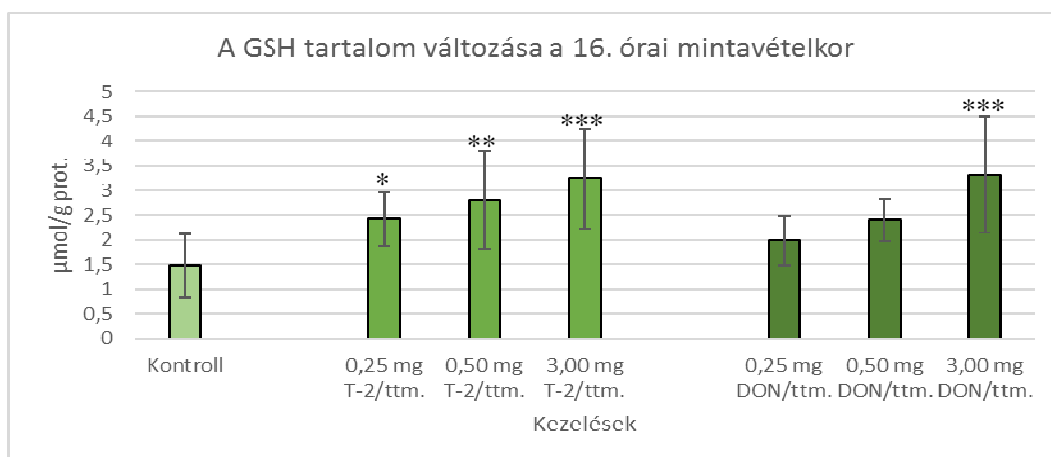
A GST aktivitás viszont a 3,0 mg T-2 toxin/kg ttm. kezelt csoportban csökkent a kontrollhoz képest a 8. órai mintavételnél, majd a 16. óra után ismét nőtt ($p < 0,01$). A 0,5 mg

T-2 toxin/kg ttm. kezelt csoportban viszont csak a mikotoxin terhelés 24. órájában volt szignifikánsan ($p < 0,05$) nagyobb.

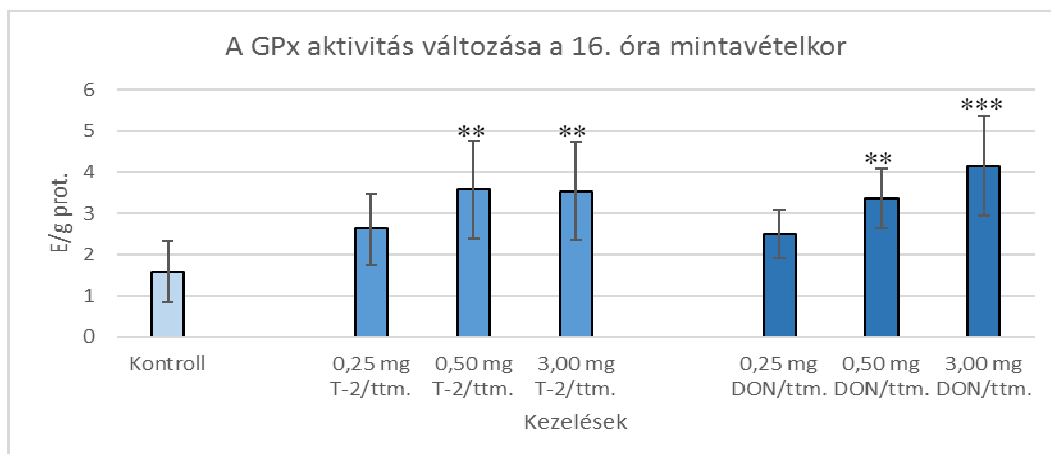
A GR aktivitásában emelkedett értékeket tapasztaltunk a 0,5 mg DON/kg ttm. csoportban 16. és 24. órai mintavétel alkalmával ($p < 0,01$), valamint a 0,5 mg T-2 toxin/kg ttm. csoportban a 24. órát követően ($p < 0,05$). A 3,0 mg T-2 toxin/kg ttm. csoportban viszont a GR aktivitás szignifikánsan kisebb volt ($p < 0,05$) a kontrollhoz viszonyítva a 8. órai mintavételkor.

Az eredmények alapján levonható az a következtetés, hogy a halak antioxidáns rendszere gyorsan és sikeresen aktiválódott a toxin expozíció hatására, amint azt a megemelkedett értékek jól jelzik. Néhány esetben azonban a kontroll csoporthoz viszonyítva csökkenést is tapasztaltunk (GR és GST aktivitás a 8. órai mintavétel, 3 mg T-2 toxin/kg ttm.), ami arra utal, hogy míg egyes enzimek aktivitása nő, addig másoké azonos időszakban csökken. Ennek oka lehet a hirtelen nagy dózisú T-2 toxinnak a génexpresszióra, vagy az enzim fehérje poszt-transzlációs modifikációjára kifejtett hatása. Előbbi feltevést – génexpresszió – támasztja alá hogy a későbbiekben az aktivitás visszatért a kontroll, vagy annál szignifikánsan magasabb értékre (4. ábra).

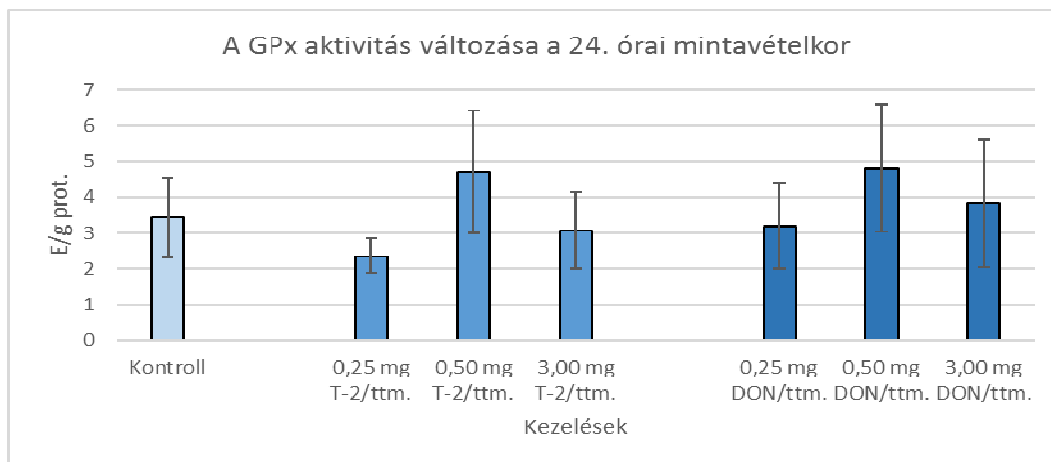
A vizsgált paraméterek közül dózis-hatás összefüggés látható a talált tendenciák alapján (GSH, GPx, GST, MDA) a 16. órai mintavételkor (1. és 2. ábra), sőt ez a tendencia a GSH esetében megmarad a 24 órai mintavételkor is. A GPx és GST aktivitásában viszont a legnagyobb mikotoxin dózis hatására már csökkenést tapasztaltunk, ami a glutation redox rendszer kimerülését vagy feedback mechanizmuson alapuló csökkenést (3. ábra) jelenthet.



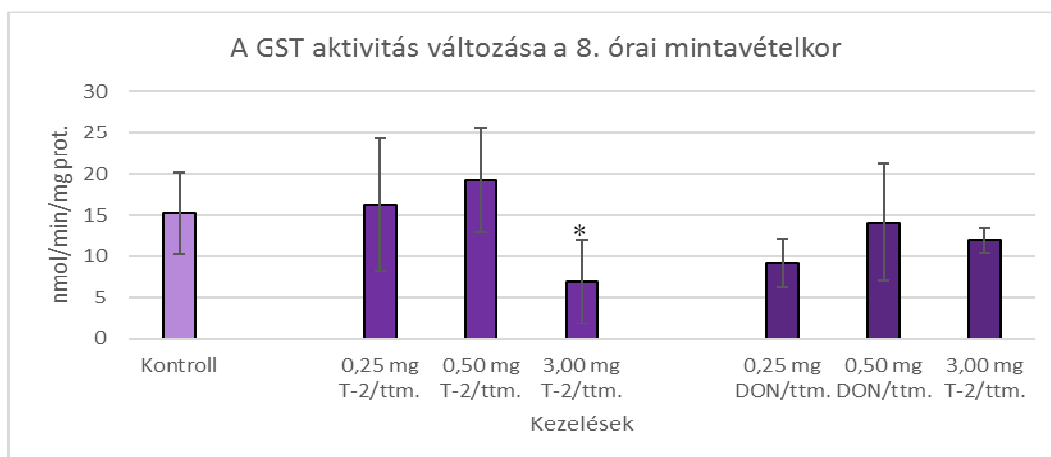
1. ábra: A GSH tartalom alakulása a 16. órai mintavétel során (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ a kontrollhoz viszonyítva)



2. ábra: A GPx aktivitás alakulása a 16. órai mintavétel során (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ a kontrollhoz viszonyítva)



3. ábra: A GPx aktivitás alakulása a 24. órai mintavétel során



4. ábra: A GST aktivitás alakulása a 24. órai mintavétel során ($p < 0,05$ a kontrollhoz viszonyítva)

4. Következtetések, javaslatok

Az egyszeri, gyomorszájon át bejuttatott, mikotoxin dózisok rövid időn belül fokozták a pontyok májában - a xenobiotikum transzformáció központjában - a lipidperoxidációs folyamatokat, amint azt az emelkedett CD és CT értékek jelezték. A legnagyobb T-2 toxin terhelés hatására rövid időn belül jelentős mértékű mortalitás is fellépett.

A növekvő reaktív oxigén szabadgyök (ROS) terhelés hatására azonban a glutation redox rendszer gyorsan aktiválódott, ami eliminálta a mikotoxinok által generált peroxidatív folyamatokat, így a lipidperoxidációs folyamatok végterméke, az MDA tartalom, már nem emelkedett szignifikáns mértékben. A glutation redox rendszer vizsgált elemeinek mennyisége/aktivitása eltérő irányban és mértékben változott a mikotoxin terhelés hatására, amelynek oka az génexpressziót szabályozó eltérő mechanizmusok lehetnek, mivel a 8 órás eltolódás az aktivitás csökkenésben, majd növekedésben már elegendő a fehérje szintézishez.

A kutatásokat az OTKA PD 104823 pályázat támogatásával végeztük.

5. Felhasznált irodalom

- AOAC (1984): Official Methods of Analysis (28.054) 14th edition. Arlington, VA, USA
- Davies, K. J. A. (1995): Oxidative stress, the paradox of aerobic life. In: *Rice-Evans, C. - Halliwell, B. - Land, G. (Eds.), Free Radical and Oxidative Stress: Environment, Drugs and Food Additives*. London, Portland Press, pp. 1-31.
- Döll, S., Baardsen, G., Koppe, W., Stubhaug, I., Dänicke, S. (2010): Effects of increasing concentrations of the mycotoxins deoxynivalenol, zearalenone or ochratoxin A in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) on growth performance and health. *Proc. 14th International Symposium on Fish Nutrition and Feeding*, Qingdao, China, p. 120.
- Hooft, J.M., Elmor, A.E.H.I., Encarnação, P., Bureau, D.P. (2011): Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is extremely sensitive to the feed-borne *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol (DON) *Aquaculture* 311: 224-232.
- Guan, S., He, J., Young, J.C., Zhu, H., Li, X.-Z., Ji, C., Zhou, T., (2009): Transformation of trichothecene mycotoxins by microorganisms from fish digesta. *Aquaculture* 290. 290-295.
- Lowry, O. H. - Rosenbrough, N. J. - Farr, A. L. - Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193. 265-275.
- Mannervik, B. - Alin, P. - Guthenberg, C. (1985): Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82. 7202-7206.
- Manning, B.B., Abbas, H.K., Wise, D.J., Greenway, T. (2013): The effect of feeding diets containing deoxynivalenol contaminated corn on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) challenged with *Edwardsiella ictaluri*. *Aquacult. Res.* 54: 1-5.
- Matkovics, B. - Szabó, L. - Sz.Varga, I. (1988): Lipidperoxidáció és redukált glutation anyagszere enzimek aktivitás meghatározása biológiai mintákban. *Lab. Diagn.* 15. 248-250.
- Manning, B.B., Li, M.H., Robinson, E.H., Gaunt, P.S., Camus, A.L., Rottinghaus, G.E. (2003): Response of channel catfish *Ictalurus punctatus* to diets containing T-2 toxin. *J. Aquat. Anim. Health* 15. 230-239.
- Maul R, Warth B, Kant JS, Schebb NH, Krska R, Koch M, Sulyok M (2012): Investigation of the hepatic glucuronidation pattern of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in various species. *Chem Res Toxicol* 25.2715-2717.
- Mézes, M. - Barta, M. - Nagy, G. (1998): Comparative investigation on the effect of T-2 mycotoxin on lipid peroxidation and antioxidant status in different poultry species. *Res. Vet. Sci.* 66: 19-23.
- Placer, Z. A. - Cushman, L. L. - Johnson, B. C. (1966): Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems *Anal. Biochem* 16.359-364.
- Poston, H. A. (1983): Biological effects of dietary T-2 toxins on rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 2: 79-88.
- Sedlak, J. - Lindsay, R. H. C. (1968): Estimation of total, protein bound and non-protein sulf-hyryl groups in tissue with Ellmann's reagent. *Anal. Biochem.* 25.192-205.
- Smith, I. K. - Vierheller, T. L. - Thorne, C. A. (1988): Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* 175. 408-413.
- Statsoft Inc., (1993): Statistica for Windows, Release 4.5. Statsoft Inc.
- Surai, P. F. - Dvorska, J. E. - Sparks, N. H. C. - Jaques, K. A. (2002): Impact of mycotoxins on the body's antioxidant defence. In: Lyons T.P., K.A Jaques eds: *Nutritional biotechnology in the feed and food industries*. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 131-142.
- Uhlig S, Ivanova L, Fæste CK (2013): Enzyme-assisted synthesis and structural characterization of the 3-, 8-, and 15-glucuronides of deoxynivalenol. *J Agric Food Chem* 61(8):2006-2012.
- Wood, G. E. (1992): Mycotoxins in foods and feeds in the United States. *J. Anim. Sci.* 70.3941-3949.
- Woodward, B., Young, L.G., Lun, A.K. (1983): Vomitoxin in diets for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture.* 35 : 93-101.
- Wu Q, Huang L, Liu Z, Yao M, Wang Y, Dai M, Yuan Z (2011) A comparison of hepatic in vitro metabolism of T-2 toxin in rats, pigs, chickens and carp. *Xenobiotica* 41(10). 863-873.